簡介 近紅外光譜儀在化學分析上的應用

◎農試所農藝組 陳榮坤 楊純明

一、前言

利用近紅外光譜儀(Near infrared spectroscopy, NIRS)進行化合物的分析技術，是非破壞性分析方法中的一種，光譜範圍介於近紅外光與紅外光之間，一般指800-2500 nm的範圍。近紅外光譜儀分析主要對象以有機成分爲主，無機成分若與有機成分或水形成鍵結，具有C-H、O-H、N-H等感應官能基的結構，亦能測定。這些官能基可吸收特定能量而造成官能基內鍵結的彎曲、伸長及振動，於是光譜之吸收帶(band)隨各成分特有的官能基類別及濃度呈現不同的吸光值，可據以反推化合物種類及含量達到定性與定量分析目的，屬間接的測定方法。

農作物植體的成分分析，在傳統上必須進行取樣及前處理程序後，再利用化學分析方法進行量測。其過程較漫長，無法及時得到量測數據，甚至可能降低分析時效。又此種破壞性的分析方法，將造成樣品無法持續利用，尤在農業育種研究上常有負面影響。近紅外光譜分析法無上述缺點，並具下列優勢而成就其普遍性：(1)不需大量化學藥品，安全性高；(2)前處理技術簡單，量測過程迅速，具即時分析能力；(3)非破壞性量測，同一試材可重覆使用；(4)一次全光譜掃描，可同時分析多種化學成份；(5)多元化儀器設計及採樣系統，符合不同測試環境需求；(6)適用於固態、粉粒態、半固態及液態等不同狀態樣品。儀器廠商近年已研發出多功能多用途的不同機型，大幅縮短化學分析測定時間，準確度及精確度亦顯著提升，近來在農產品及食品成分的分析上極受重視。

二、近紅外光譜儀(NIRS)的儀器設計

不同光學設計將造成儀器成本高低差異，應用範圍也不同。近紅外光譜儀主要構造包括光源、分光系統(wavelength separation)、偵測器及採樣系統等組件。分光系統爲儀器核心，主要功能爲穩定分離之連續波長(窄波段)或選擇性波長。依分光系統設計上差異，可分類出三種主要設計型式：

1. 單波分光器(儀) (monochromators)：

使用光柵(grating)進行光束的分光，光柵功能如同稜鏡，可進行全光譜掃描而選擇性分光，穩定性佳，解析度高(約10 nm或更小)，並可配合各式採樣技術(光纖探頭、漫射、透射等)完成多功能分析任務，多使用在試驗研究及品管控制上。缺點爲價格高，且移動光柵裝置容易在掃描

作　　者：陳助理研究員榮坤
聯絡電話：(04)23302301-144

時來回磨損，導致光學精確度的誤差，故不適用於高震動、高污染及高溫的惡劣測量環境。

2. 二極體陣列光譜儀(Diode array spectrometer)：

利用近紅外光感測二極體陣列為波長選擇系統。一般在可見光及近紅外光，多使用以矽為主要材質的二極體(400-1100 nm)；近紅外光至中紅外光區的量測，則採用InGaAs (800-2200 nm)或鍺(800-1800 nm)為材質的二極體陣列來感應光輻射。其優點為不含移動元件、掃描快速(全波長一次掃描時間約2秒)及全光譜量測，然通常解析度較光柵式單波分光器稍差(>10 nm)，多連接光纖採樣系統進行品管線上監控。

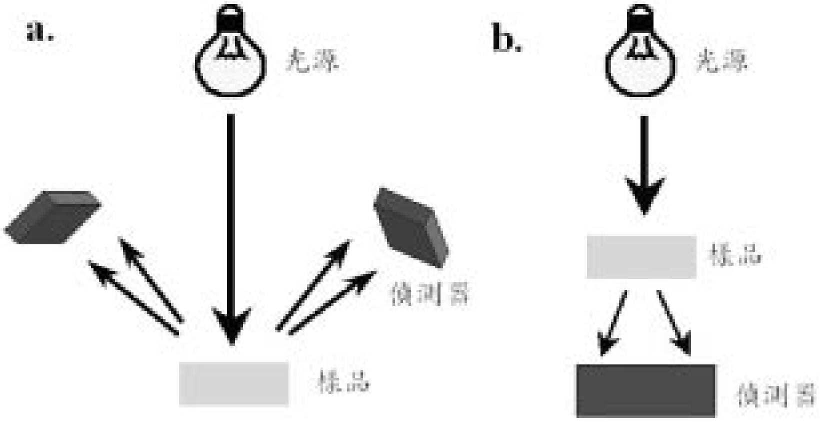
3. 濾波器(Filter instruments)：

為最簡單、最便宜的光譜儀。配合分析物已知吸收特性，採用6-20個固定波段濾片為分光系統，用於濾除或降低光源中某些波段或某段光譜的光輻射。每一固定窄波段的頻寬(bandwidth)約20 nm，具特定分析功能。需配備控溫系統以確保窄波段穩定性，屬於應用層面的儀器。優點為構造簡單、維護容易、成本低廉，缺點為無法任意選擇波段，缺乏彈性應用，僅能分析某些特定化學成份。

又光源和偵測器是近紅外光譜儀中光束路徑的開始和終點。光源多採用石英鎢絲—鹵素燈絲，波長介於360-3000 nm間，能量強度則與操作電壓有關，常需精密穩壓系統確保光源穩定。偵測器類別中，可分為適用於可見光及近紅外光(400-1100 nm)的矽偵測器，及涵蓋短波與中紅外光(1100-2500 nm)的硫化鉛偵測器。商業上多將此二種最普遍的偵測器組合成一個感應元件，以延伸光譜量測範圍。另因光輻射與物質接觸後，會產生反射、吸收及穿透等三種運動方式，不同的樣品性質及置放環境將導致此三運動方式的消長。在進行NIRS量測時，需依不同樣品性質及環境條件選擇適當的採樣配置。一般可分為二種型式，一種為反(漫)射式測量(圖一)，對具平緩表面的固體物質而言，大部份光線會反射而構成物體表面的光澤，而進入物體的光輻射有部份波長被吸收，剩餘部份則散射回外界或穿透物體。此類樣品在1公分厚度以上的穿透光輻射可予忽略，因此搜集光輻射的變化量即可分析物體的成分，常使用1100-2500 nm波長範圍，應用於靜止穀粒或粉狀樣本的成分分析。另一為穿透式測量(圖一)，偵測穿透物質的光輻射，其樣品槽多介於1-2公分厚度，因水分的干擾，常使用800-1100 nm波長範圍，以增加穿透訊號的強度，如液態物質、牛奶或酒製品等，亦可用於流動的固態物質如穀粒的線上分析等。

三、校正線(calibration model)的建立

近紅外光譜儀之成分分析，係依被測物中某一化學成分對於近紅外光譜的吸收特性而定量分析，故應用關鍵在於建立二者間的檢量線(或稱校正線)。收集能夠代表待測族群變異的樣品後，將樣品分成校正組及驗證組，分別進行NIRS反射率或穿透率測定。取得光譜數據後，利用傳統化學分析方法取得成分標準值，將校正組的光譜數據利用統計方法與其標準值建立關係方程式，此即校正線，其誤差稱為校正標準偏差(standard error of calibration, SEC)。為確定校正線的準確度，必須進行校正線的檢定，故將驗證組光譜數據代入



圖一、近紅外光譜儀的採樣配置簡圖。(a.反(漫)射式測量，b.穿透式測量)

校正線以得到預測標準偏差(standard error of prediction, SEP)，SEP應接近且略大於SEC，SEP與SEC差值愈小則校正線愈準確。

(一)光譜預處理技術

物質成分濃度(concentration, c)與近紅外光反(散)射光譜(reflectance, R)的關係常比擬為畢耳定律(Beer's law)(Murray and Williams, 1990)，即 log (1/R)=kc，k=constant。此關係雖無正式理論支持，但由其演算結果仍有令人滿意的準確度，而被廣為接受。在進行數據統計分析前，可將光譜數據(log(1/R))經過預處理(pre-processing)，以降低雜訊，確保光譜品質。消除雜訊可經由多種不同數學方法達成，功能在降低基線平移(baseline shift)、強化重複波帶解析度及消除固體樣本粒徑大小產生的散射干擾。影響光譜品質最嚴重的因子是樣品顆粒大小，Hruschka(1990)曾指出改變樣本顆粒大小會造成樣本反射量的改變，較大顆粒有較大吸收值，其間關係為倍數性，即不同粒徑會產生log(1/R)各種比例的光譜曲線。校正固體樣品粒徑大小所產生的散射干擾大多採用微分方法，將二相鄰波長反射值進行一次微分(first derivative)處理，得到二相鄰波長光譜的斜率值，平滑化(smoothing)該光譜波長片段。將二個相鄰的一次微分值再微分一次，即得二次微分(second derivative)。微分的好處有二，重疊波峰的解析度在微分後被加強，愈複雜的光譜愈能顯出微分技術的好處，又微分可降低不同粒徑所造成的雜訊影響(Norris and Williams, 1984)。

(二)迴歸技術

由於不同成分在近紅外光譜的吸收峰帶相互重疊，尤其在分析組成複雜的樣品時，無法利用單一窄波段的光譜反射值進行迴歸預測，必須依賴多變量統計分析來描述化學成分特性及濃度與部份光譜或全光譜的關係。近紅外光譜分析上常見的多變量統計分析簡述如下：

1. 多元線性迴歸(multiple linear regression, MLR)：

最早應用在近紅外光譜分析的方法，利用不同光譜波段反射率與分析物濃度的線性關係做為校正線。應用前提為樣品數須多於使用的波段數，選擇的各單一波段

間相關性不可過高，以避免多元共線性(multicollinearity)的發生。因此MLR多用在分析成分與其它成分無任何交互作用時，選擇與該分析成分有較高線性關係的少數幾個波段進行迴歸分析，建立校正線。較適合應用於僅使用少數波段濾片的濾波器式近紅外光譜儀。

2. 主成分迴歸(principal component regression, PCR)與淨最小平方差迴歸(partial least squares regression, PLSR)：

相較於MLR利用少數波段建立校正線的統計方法，PCR與PLSR可使用部份光譜區域或全光譜進行分析，可放寬波段數或無需波段選擇的進行統計。分析方法爲將與分析成分具高度相關性的波段歸於一個特徵向量(eigenvectors)中，再將數個特徵向量取代原始光譜進行線性迴歸，建立校正線。由於特徵向量間相互獨立，在波段數大於樣品數時，不會發生MLR的多元共線性問題(Helland, 1988)，準確性較高。PLSR的發展較PCR晚，是針對波段數大於樣品數時所發展出的方法，預測準確性較PCR高(劉等，1997)。因此，近年來近紅外光譜儀廠商所搭售的分析軟體，有以PLSR統計分析爲主的趨勢。而當分析物中含有較嚴重的非線性現象時，例如化學成分間的相互吸引、氫鍵影響或非均勻分布的樣品，可使用類神經網路(artificial neural networks; ANNs)進行數據處理。

(三)定性分析

定性與定量分析之校正模型目的均爲預測，不同的是定性分析預測未知樣品所屬的族群別，定量分析則預測分析成分的數值。定性分析是NIRS的另一應用方向，藉以區別樣本族群間的差異，如咖啡與酒類的產地鑑別、果汁眞僞的區分、食用油的種類、穀物產地產季鑑別及中草藥原料鑑定等應用。其數學原理在於利用不同樣品族群的平均值及標準偏差，建立各族群在多維空間中所處的位置，並判斷未知樣品所歸屬的族群。統計方法常先以主成分分析(principal component analysis, PCA)或集群分析(cluster analysis)探討各樣品族群的光譜數據分布，再以幾何學的距離量測方法如馬氏距離(mahalanobis distance)等進行鑑別分析(discriminant analysis)(Mark, 1992)。若操作系統中存在非線性分離的族群，利用ANNs發展出的鑑別模型可有效解決(Hervas *et al*., 1994)。

四、應用近紅外光譜分析技術應注意的項目及其限制

雖然近紅外光譜儀進行定性或定量分析具有快速、簡便及準確度高等優點，但其統計分析及校正過程較一般化學分析複雜，若對樣品認識不夠，未考量眞實樣品的複雜性，使用錯誤的採樣方法或設置，以及不瞭解數據處理的原理等，均無法得到良好的預測結果。進行近紅外光譜分析時，至少應注意以下幾點(羅等，1999)：(1)瞭解樣品理化性質的變化，並收集具代表性樣品群，以建立校正線。並試排除誤差來源，如樣品中化學成分間的相互能量關係、樣品研磨前後的含水率變化及空氣間隙率等。(2)採樣條件一致化，以減少樣品非均勻分佈的錯誤。例如研磨樣品的顆粒大小、粒徑分布等都會影響預測準確度，應予注意。(3)發展定量校正線時，仍須評估標準化學分析方法的眞實性及其誤差範圍。如果標準化學分析方法的誤差甚大，則校正線不具意義。(4)熟悉化學計量學中各種多變量分析技術的使用條件與確

認程序，如光譜數據的預處理、校正線預測能力的判別基準及建立校正線所用的樣品與驗證用樣品的獨立性等。(5)定期評估儀器穩定性與模型適用性，必要時須增加樣品予以再度校正。

實際應用NIRS技術時，需認識其先天限制條件，才能充分發揮其功能: (1)被測物的有效分析成分濃度宜高於0.5%以上，0.5%以下的有效分析成分測得的準確度不高。欲降低其偵測極限，則須仰賴更複雜的統計分析或更精密的光學設計。(2)NIRS分析技術爲純經驗方法，須倚賴其它傳統化學分析方法測得的數據建立校正線，其準確性無法超過原化學分析方法，預測誤差也較大，而且校正線的應用不可逾越其樣品族群範圍(即不適用外插估測)。(3)農業應用上，被測物受栽培條件影響甚大，不同品種、栽培季節或年度、氮肥施用量等都會造成被測物內部理化性質的差異及化學成份間相互干擾，校正線均必須重新建立，此亦NIRS技術在農業應用最大限制。

五、結語

近紅外光譜分析技術在近年來有長足的進步，其校正線的模型發展也日趨成熟，使得此項技術更具吸引力。在農業領域中，由於農產品各部位的成分常呈非均質分布，且不同個體族群間(如不同品種、產季)差異較大，造成應用上較其它領域困難。因此，充分認識近紅外光譜分析技術的基本特性及優缺點，熟悉並採用正確的採樣技術及校正方法，以及加強對受測物理化性質的認識，以深入瞭解應用在不同項目的適當性，才能發揮NIRS的適當功能，提供最有效率的分析方法及最適切的應用方式。

六、參考文獻

劉昌群、彭智平、蕭介宗。1997。稻米近紅外線光譜之多變數分析。農業機械學刊6(3)：9-19。

羅蘇秦、張世英。1999。近紅外光譜儀器之分析技術及其應用。科儀新知20(5)：13-30。

Hervas, C., A. Garrido, B. Lucena, N. Garcia and E. De Pedro. 1994. Near-infrared spectroscopy for classification of Iberian Pig Carcasses using an Artificial Neural Network. J. Near Infrared Spectrosc. 2:177-184.

Hruschka, W. R. 1990. Data analysis: wavelength selection methods. p.35-40. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Eds. by P. C. Williams and K. H. Norris. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.

Murray, I. and P. C. Williams. 1990. Chemical principle of near-infrared technology. p.17-24. In: Near-infrared technology in the agricultural and food industries. Eds. by P. C. Williams and K. H. Norris. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.

Norris, K. H. and P. C. Williams. 1984. Optimisation of mathematical treatments of raw near-infrared signal in the measurement of protein in hear red spring wheat. I. Influence of particle size. Cereal Chem. 61:158-165.

Mark, H. 1992. Qualitative discriminant analysis. p.329-363. In: Handbook of near-infrared analysis. Eds. by D. A. Burns and E. W. Ciurczak. Marcel Dekker. New York.